

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Januar 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/006636 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/08, 5/10,
A61K 39/00, A61P 35/00, 37/00, 33/00, 31/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07740

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juli 2002 (11.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 33 926.7 12. Juli 2001 (12.07.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): GENETHOR GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Str.
10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SHERIFF, Ahmed
[DE/DE]; Geibelstr. 1, 12305 Berlin (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22
41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: REDUCTION OF THE STIMULATORY CAPACITY OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS

(54) Bezeichnung: REDUKTION DER STIMULATIONSFÄHIGKEIT VON ANTIGEN PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for reducing immune reactions. The inventive method is characterized by manipulating the stimulatory properties of antigen-presenting cells and optionally at the same time inducing the antigen-presenting cells to present defined antigens.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beruht auf einer Reduktion von Immunreaktionen. Bei dem Verfahren werden die stimulatorischen Eigenschaften von Antigen präsentierenden Zellen manipuliert und die Antigen präsentierenden Zellen werden gegebenenfalls gleichzeitig zur Präsentation von definierten Antigenen veranlasst.



WO 03/006636 A1

Reduktion der Stimulationsfähigkeit von Antigen präsentierenden Zellen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antigen präsentierende Zellen, Verfahren zur Herstellung von Antigen präsentierende Zellen, Arzneimittel enthaltend Antigen präsentierende Zellen sowie Verwendung der Antigen präsentierende Zellen.

Seit knapp 10 Jahren werden zur Behandlung verschiedener Erkrankungen und in Tiermodellen gentherapeutische Verfahren entwickelt und angewendet. Bisher sind sie aber noch nicht in die tägliche Praxis überführt worden. Meist handelt es sich dabei um die Behandlung von genetisch bedingten, schweren Erkrankungen, für die andere Therapien nicht zur Verfügung stehen. Weiterhin wird die Gentherapie zur Behandlung von schweren und ebenfalls nicht therapierbaren Krebserkrankungen eingesetzt.

Wenig Aufmerksamkeit hat die experimentelle Medizin bisher der Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen mittels gentechnischer Methoden geschenkt.

Allgemeines zu Allergien

Allergien verursachen beträchtliche Kosten im Gesundheitswesen der Industrieländer. Immerhin sind schätzungsweise mindestens 20% der Bevölkerung gegen irgendeine Substanz allergisch. Die meisten Betroffenen leiden an allergischer Rhinitis, zu der insbesondere der Heuschnupfen zählt, oder an Bronchialasthma: Sie niesen oder ringen nach Luft, nachdem sie bestimmte Pollen oder andere im allgemeinen harmlose Substanzen eingeatmet haben. Viele Kinder und einige Erwachsene reagieren auch allergisch auf Nahrungsmittel. Andere erleiden Hautausschläge oder sogar einen allergischen Schock, nachdem sie Medikamente wie Penicillin erhalten haben. Bei wieder anderen rufen Bienenstiche starke lokale Schwellungen oder schwere systemische - den gesamten Organismus erfassende - Störungen hervor. Im Extremfall können allergische Anfälle sogar zum Tod führen. Allein die unmittelbare medizinische Versorgung von Asthmapatienten hat in den USA 1990 schätzungsweise 3,6 Milliarden Dollar verschlungen und damit rund ein Prozent aller Kosten im

- 2 -

Gesundheitswesen ausgemacht.

Mittlerweile ist bekannt, dass einige der zellulären und molekularen Wechselwirkungen bei allergischen Reaktionen oft ähnlich ablaufen, unabhängig davon, auf welche Substanzen der einzelne anspricht und welche Symptome er entwickelt. Gewisse Begleiterscheinungen der Allergien treten normalerweise ausschließlich auf, wenn das Immunsystem Parasiten bekämpft. So reagiert der Körper auf Schmarotzer ebenso wie auf Allergene mit der massiven Produktion von Molekülen, die als Immunglobulin-E-Antikörper (IgE) bezeichnet werden. Die Produktion dieser Antikörper wird durch T-Helfer-Zellen induziert, die wiederum von B-Zellen aktiviert werden.

Sensibilisierung

Unterschiedliche Allergene rufen unter anderem deswegen verschiedenartige Symptome hervor, weil sie mit dem Immunsystem in verschiedenen Körperregionen in Berührung kommen. In den oberen Luftwegen erzeugt die fehlgeleitete Immunreaktion Niesen und eine verstopfte Nase. In den unteren Luftwegen können dagegen die Bronchien sich verengen und verschleimen, so dass typische asthmatische Symptome auftreten. Entsprechend rufen Immunaktivitäten in den Geweben des Magen-Darm-Traktes Übelkeit, Bauchkrämpfe, Durchfall oder Erbrechen hervor.

Schließlich vermag ein Allergen, das auf irgendeinem Weg ins Blut gelangt, eine Anaphylaxe auszulösen: eine allergische Reaktion in weit von seiner Eintrittsstelle entfernten Körperregionen. Schwere anaphylaktische Schocks können alle normalen Körperfunktionen durcheinanderbringen und tödlich enden.

Auch wenn sich die allergischen Reaktionen unterschiedlich Äußern, werden sie doch stets durch den gleichen Mechanismus in Gang gesetzt: die Sensibilisierung. Dazu kann bereits der einmalige Kontakt mit einem Allergen, typischerweise einem Eiweißstoff, genügen. In den Luftwegen oder anderen Geweben trifft die allergieauslösende Substanz auf sogenannte Fresszellen oder Makrophagen. Diese nehmen den Fremdstoff auf, zerlegen ihn und präsentieren die Fragmente auf der Zelloberfläche mit MHC II-Molekülen. Im weiteren Verlauf erkennen einige T-Helfer-Lymphozyten die dargebotenen Bruchstücke

- 3 -

und binden daran. Die T-Helfer-Lymphozyten werden von den Makrophagen aktiviert und aktivieren dann ihrerseits einige B-Lymphozyten, die gleichfalls das Allergen erkennen. Die B-Zellen reifen dann zu Antikörper produzierenden Plasmazellen aus. Zunächst sind dies Antikörper vom sogenannten IgM-Typ; ab einem bestimmten Zeitpunkt schalten die Plasmazellen jedoch auf IgE-Antikörper um.

Bis die Antikörper hergestellt sind, können Tage oder Wochen vergehen, und das Allergen, welches ihre Produktion in Gang gesetzt hat, ist dann möglicherweise bereits verschwunden. Nicht so die IgE-Moleküle. Mit ihrer Fc-Region heften sie sich an IgE-Rezeptoren zweier unterschiedlicher Klassen von Zellen des Immunsystems. Bei der einen Klasse handelt es sich um Mastzellen, die sich im Körpergewebe für gewöhnlich in der Nähe von Blutgefäßen und Epithelzellen ansiedeln. Über das Epithel besteht Kontakt mit der Außenwelt (darunter fällt auch das Epithel der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes). IgE-Antikörper binden außerdem an basophile Granulozyten (Basophile). Diese Zellen zirkulieren allerdings im Blutstrom.

Hat die Produktion der IgEs einmal begonnen, hält sie offenbar Monate, ja manchmal sogar Jahre an. Folglich besetzen sie unablässig IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen - bereit, beim nächsten Allergenkontakt augenblicklich in Aktion zu treten.

Akute Symptome

Während also die erste Begegnung mit einem Allergen selbst bei Personen, die sich später als Allergiker entpuppen, keine Symptome hervorruft, leitet die Zweitexposition ein Stadium der Überempfindlichkeitsreaktion ein, welches auch äußerlich in Erscheinung tritt. Innerhalb von Sekunden nach dem Kontakt mit menschlichem Gewebe bindet der allergieauslösende Stoff an die IgEs der Mastzellen. Heftet er sich dabei an zwei oder mehr IgE-Moleküle zugleich, bildet er eine Brücke zwischen ihnen. Solche Quervernetzungen lassen die betroffenen IgE-Rezeptoren dichter zusammenrücken, und dies aktiviert die Zelle, so dass sie hochwirksame Substanzen ausschüttet, die auf direktem Wege allergische Symptome erzeugen. (Die Freisetzung kann auch auf andere

Arten hervorgerufen werden; von allergischen Reaktionen spricht man nur, wenn IgEs beteiligt sind). Die wichtigste dieser Substanzen ist Histamin. Es kann sowohl die Schleimbildung in den Epithelien anregen und so zur Verstopfung der Luftwege beitragen als auch die glatte Muskulatur, die wie ein elastisches Band Bronchien und Därme umschlingt, kontrahieren lassen. Ferner vermag es die feinen Blutgefäße zu weiten und durchlässiger zu machen, so dass Flüssigkeit ins Gewebe sickern kann. Rötungen und Schwellungen sind die Folge. Betreffen diese Gefäßveränderungen große Teile des Körpers, können sie ein tödliches Kreislaufversagen auslösen: Bei einem solchen Schock fällt der Blutdruck jäh so stark ab, dass die Sauerstoffversorgung von Herz und Gehirn nicht mehr gewährleistet ist.

Die zweite Gruppe von Mediatoren besteht hauptsächlich aus Prostaglandinen und Leukotrienen. Sie werden erst ausgeschüttet, nachdem die Allergenmoleküle sich an die IgEs auf den Zellen angelagert haben. Wie Histamin verengen sie die Bronchien und erweitern die Blutgefäße. Ihre Wirkung hält allerdings länger an.

Zusätzlich stoßen stimulierte Mastzellen eine Vielzahl potentiell toxischer Enzyme aus. Offenbar setzen sie ferner Cytokine frei, die die Aktivitäten anderer Immunzellen regulieren.

Behandlung: 1. Die allergische Rhinitis

Antihistaminika erweisen sich in der Regel als wirksam und dienen immer noch als Standardtherapie. Die neuesten Varianten können die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr ohne weiteres passieren und machen die Patienten nicht mehr müde. Wenn bei einer schweren Entzündung Antihistaminika wirkungslos bleiben, helfen oft inhalierbare Corticosteroide, die gewöhnlich zur Linderung der chronischen Entzündung bei Asthma verschrieben werden.

In schweren Fällen kann die schon im Jahre 1911 eingeführte Immuntherapie oder Hyposensibilisierung (auch als Allergiespritzen oder Desensibilisierung bekannt) auf lange Sicht Erleichterung verschaffen. Bei dieser Behandlung injizieren Ärzte den Patienten steigende Dosen des Allergens, auf das diese empfindlich reagieren. In allen Fällen ist die Dosis ausschlaggebend: Zu wenig

Allergen verleiht keine Toleranz. Außerdem ist der Schutz selten vollständig.

2. Asthma

Bronchodilatoren sind die meistverwendeten Arzneimittel bei Asthma. Sie lindern die durch Histamin und andere Bronchokonstriktoren hervorgerufenen Symptome sehr schnell, beeinflussen die zugrundeliegende Entzündung jedoch wahrscheinlich nicht. Außerdem kann ihr übermäßiger Gebrauch eine Gegenreaktion des Körpers hervorrufen, so dass nach Abklingen ihrer Wirkung der Atemstrom stärker behindert ist als zuvor. Zusätzlich kommen die unter 1. aufgezählten Methoden zur Anwendung.

3. Anaphylaktische Reaktionen

Insektenstiche rufen bei manchen Menschen Anaphylaxien aus. In schweren Fällen führen diese zum Tod durch z.B. Kreislaufversagen oder Ersticken. Jede schwere Anaphylaxie - gleich ob sie zum ersten oder weiteren Mal auftritt - ist ein Notfall, bei dem zunächst versucht werden muss, die bedrohlichsten Symptome zu beherrschen. Meist geschieht das durch Injektion von Adrenalin, welches die Freisetzung von Mediatoren hemmt, die Luftwege öffnet und der Erweiterung der Blutgefäße entgegenwirkt. Man kann vorbeugend durch eine Immunisierung mit dem Gift des gesundheitsbedrohenden Insekts agieren.

Neue Ansätze

In der Erprobung im Tiermodell befindet sich die auf DNA basierende Immunisierung mit einem Allergen (Der p 5) der Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus*. Diese Immunisierung resultiert in einer Produktion von IgG, aber nicht IgE, und resultiert in einer 90%igen Reduktion der Mengen an spezifischem IgE, welche durch klassische Sensibilisierung mit Der p 5 und Alaun als Adjuvant oder allergen-induzierte Rhinitis hervorgerufen wurde.

Eine weitere Strategie ist die Verwendung von humanisierten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern gegen die FcεRI-Binderegion für IgE. Dadurch wird die Bindung von IgE an den IgE-Rezeptor verhindert, so dass keine Mediatoren der allergischen Reaktion von Mastzellen oder Basophilen ausgeschüttet werden können. Diese Strategie hat in klinischen Studien bei Patienten mit allergi-

- 6 -

scher Rhinitis und allergischem Asthma gezeigt, dass diese Antikörper gut toleriert werden und die allergischen Reaktionen reduzieren.

(siehe auch L.M. Lichtenstein: "Allergie und Immunsystem"; in Spektrum der Wissenschaft Spezial: Das Immunsystem; 1994; 74-83; S-K Huang, K-Y Chua und K-H Hsieh: Allergen gene transfer. Current Opinion in Immunology 1997; 800-804; C. Heusser und P. Jardieu: Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. Current Opinion in Immunology 1997; 805-814).

Allgemeines zu Transplantationen

Die Transplantation von Geweben, um kranke Organe zu ersetzen, ist heute eine wichtige medizinische Therapie. In den meisten Fällen stellt eine Reaktion des anpassungsfähigen Immunsystems gegen das Transplantat die größte Bedrohung für eine erfolgreiche Behandlung dar. Reaktionen des anpassungsfähigen Immunsystems werden von Antigen präsentierenden Zellen durch Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten induziert. Bei der Transfusionen von Blut, welches das erste und am häufigsten verwendete Transplantat ist, müssen die ABO und Rh Blutgruppenantigene abgeglichen werden, damit die schnelle Zerstörung unpassender Erythrozyten vermieden wird. Bei anderen Geweben müssen die sehr polymorphen Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) aufeinander abgeglichen werden, da diese fast immer die Immunreaktion auslösen. Leider ist der perfekte Abgleich der MHCs außer bei Verwandten fast unmöglich.

Stammzelltransplantate bei Leukämien

Leukämie ist Krebs der Blutzellen. Pro Jahr erkranken 50 von 1 Million Menschen an Leukämie. Im Verlauf der Leukämie produziert der Körper große Mengen abnormaler Blutzellen. Bei den meisten Arten von Leukämie, sind die abnormalen Zellen weiße Blutzellen. Das Erscheinungsbild und die Funktionalität der Leukämiezellen unterscheidet sich von dem normaler Blutzellen.

Leukämiearten

Es gibt etliche Leukämiearten. Üblicherweise unterscheidet man grob zwei Klassen. Die eine ist bestimmt über die Schnelligkeit, mit der sich die Krankheit entwickelt und verschlimmert wird. Die andere wird durch den betroffenen Blutzelltyp bestimmt.

Leukämie ist entweder akut oder chronisch. Bei der akuten Leukämie sind die abnormalen Blutzellen unreife Blasten, die ihre normalen Funktionen nicht ausfüllen können. Die Anzahl von Blasten steigt schnell an und die Leiden werden schnell schlimmer. Bei chronischer Leukämie sind einige Blasten präsent, aber im allgemeinen sind diese Zellen reifer und können einige ihrer normalen Funktionen erfüllen. Die Anzahl von Blasten steigt auch langsamer an als bei der akuten Leukämie. Bei der chronischen Leukämie verschlimmert sich die Erkrankung allmählich.

Leukämie kann in einer von zwei Haupttypen von weißen Blutzellen erscheinen: lymphoide Zellen oder myeloide Zellen. Bei der lymphatischen Leukämie sind die lymphoiden Zellen betroffen. Sind die myeloiden Zellen betroffen wird die Krankheit myeloische Leukämie genannt.

Die am häufigsten vorkommenden Leukämien sind:

- Die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Leukämie bei kleinen Kindern. Diese Erkrankung kann aber auch Erwachsene insbesondere ab dem 65. Lebensjahr treffen.
- Akute Myeloische Leukämie (AML) kommt bei Erwachsenen und Kindern vor. Dieser Leukämietyp wird auch Akute Nicht-Lymphatische Leukämie (ANLL) genannt.
- Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) trifft meistens Erwachsene ab dem 55. Lebensjahr. Sie tritt manchmal auch bei jüngeren Erwachsenen auf, betrifft aber so gut wie nie Kinder.
- Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) kommt meist bei Erwachsenen vor. Eine geringe Zahl von Kindern entwickelt diesen Krebs auch.

Leukämische Zellen sind abnormale Zellen, welche die Funktionen normaler Blutzellen nicht wahrnehmen können. Sie sind nicht in der Lage, Infektionen zu bekämpfen. Aus diesem Grund entwickeln Menschen mit Leukämie oft Infektionen, die mit Fieber verbunden sind.

- 5 Menschen mit Leukämie weisen oft auch weniger gesunde rote Blutzellen und Blutplättchen auf, so dass nicht genug rote Blutzellen für den Sauerstofftransport zur Verfügung stehen. Diese anämischen Begleiterscheinungen belasten die Patienten zusätzlich.

- 10 Wie alle Blutzellen wandern leukämische Zellen durch den Körper. Abhängig von der Anzahl der abnormalen Zellen und dem Ort, an dem sich diese Zellen sammeln, können Patienten mit Leukämie eine Reihe von Symptomen aufweisen.

- Bei der akuten Leukämie erscheinen und verschlechtern sich die Symptome schnell. Bei der chronischen Leukämie erscheinen die Symptome erst spät.
- 15 Wenn Symptome erscheinen, sind sie normalerweise zuerst mild und verschlechtern sich allmählich.

Symptome für Leukämie:

- * Fieber, Frösteln und andere grippeartige Symptome;
- * Schwäche und Ermüdung;
- 20 * häufige Infektionen;
- * Verlust des Appetites und/oder Gewichtes;
- * geschwollene oder empfindliche Lymphknoten, Leber, oder Milz;
- * schnelles Bluten oder blaue Flecken;
- * kleine rote Flecken unter der Haut;
- 25 * geschwollenes oder blutendes Zahnfleisch;
- * Schwitzen, besonders nachts; und/oder
- * Knochen- oder Gelenkschmerzen.

Bei der akuten Leukämie können sich die abnormalen Zellen im Gehirn oder im Rückenmark (zentrales Nervensystem oder CNS) sammeln. Das Resultat können dann Kopfschmerzen, Übelkeit, Konfusion, Verlust der Kontrolle über die Muskeln und Schlaganfälle sein. Leukämische Zellen können sich auch in den Hoden sammeln und verursachen dort eine Schwellung. Einige Patienten entwickeln schmerzende Augen oder Haut. Leukämie kann auch den Verdauungstrakt, die Nieren, Lunge oder andere Teile des Körpers beeinflussen.

Bei der chronischen Leukämie können sich die abnormalen Zellen allmählich in verschiedenen Körperteilen ansammeln. Chronische Leukämie kann die Haut, das CNS, den Verdauungstrakt, die Nieren und die Hoden beeinflussen.

Behandlung von Leukämie:

Die Behandlung von Leukämie ist komplex. Sie variiert mit der Art der Leukämie und ist nicht bei allen Patienten gleich. Die Behandlung hängt auch von bestimmten Eigenarten der leukämischen Zellen ab, und dem Ausmaß der Erkrankung, und ob die Leukämie schon mal behandelt wurde. Auch das Alter des Patienten, die Symptome und der generelle Gesundheitszustand sind von Bedeutung.

Die akute Leukämie muss sofort behandelt werden. Patienten mit chronischer Leukämie, die keine Symptome zeigen, müssen dagegen nicht sofort behandelt werden. Leider kann die chronische Leukämie selten geheilt werden.

Behandlungsmethoden:

Die meisten Patienten mit Leukämie werden mittels Chemotherapie behandelt. Einige werden zusätzlich bestrahlt und/oder erhalten eine Knochenmarkstransplantation (BMT) oder biologische Therapien. In einigen Fällen kann eine Entfernung der Milz helfen. Vor einer Knochenmarkstransplantation erhalten die Patienten eine Ganzkörperbestrahlung in Verbindung mit einer Chemotherapie, um das Leukämieproduzierende Knochenmark zu zerstören.

Das gesunde Knochenmark kann von einem Spender kommen oder es kann vom Patienten stammen. Dann wird es vor der Behandlung mit cytotoxischen Substanzen entnommen und ex vivo behandelt, um leukämische Zellen zu

entfernen. Danach ist ein mehrwöchiger Krankenhausaufenthalt nötig, damit das Transplantat wieder ausreichend Lymphozyten produzieren kann. In der Zwischenzeit müssen die Patienten vor Infektionen geschützt werden.

Die biologischen Therapien beinhalten Behandlungen mit Substanzen, die die Immunantwort gegen den Krebs beeinflussen. Interferone, Interleukine und Koloniestimulierende Faktoren werden z.B. bei einigen Leukämietypen verwendet. Sie werden meist mit Chemotherapie oder Knochenmarkstransplantation kombiniert.

Knochenmarkstransplantation

10 Patienten mit Knochenmarkstransplantat haben ein erhöhtes Risiko für Infektionen, Blutungen und andere Nebeneffekte der hohen Dosen der Chemotherapeutika und der Bestrahlung, die sie erhalten. Zusätzlich kann es zu Transplantat-gegen-Empfänger-Antworten [graft versus host disease (GVHD)] kommen. Die Leber, die Haut und der Verdauungstrakt sind dabei die am häufigsten betroffenen Organe. GVHD kann mild oder schwerwiegend sein und
15 jederzeit nach der Transplantation auftreten (auch Jahre später). Immunsuppressiva werden verabreicht, um das Risiko des GVHD zu vermindern und zu behandeln.

Chronische Myeloide Leukämie

20 Am Beispiel der Chronischen Myeloiden Leukämie wird im folgenden die Wirkungsweise der Knochenmarkstransplantate erläutert:

Allologe Knochenmarkstransplantationen [bone-marrow transplantation (BMT)] stellten in den vergangenen 20 – 30 Jahren Behandlungsmöglichkeiten für die chronische myeloide Leukämie (CML) bereit. Allerdings lassen sich für etwa
25 60% der Patienten keine geeigneten Spender finden.

CML ist in der frühen chronischen Phase durch eine einzelne ermittelte transformierende genetische Abnormalität charakterisiert. Es handelt sich dabei um die t(9;22) Translokation (Philadelphia Chromosome, Ph), die das bcr-abl Onkogen kreiert, den einzigen Faktor, der unbedingt für die Entwicklung der
30 Krankheit benötigt wird (Daley et al 1990). Verglichen mit anderen Tumorty-

pen in der chronischen Phase besitzen CML Patienten ein relativ intaktes Immunsystem (Lewalle et al 1996). CML ist für eine tumorspezifische Immunantwort zugänglich. In den vergangenen 20 – 30 Jahren wurden Anti-Tumor-Antworten von allogenen Knochenmarkstransplantaten (allo-BMT) und zuletzt
5 auch von Spender-Leukozyten-Infusionen [Donor leukocyte infusion (DLI)] klinisch zur Behandlung von CML ausgenutzt.

Die Erkennung und Auslöschung von verbleibenden Tumorzellen durch Spenderimmunen-
zellen scheint essentiell für die Induktion einer molekularen Remission zu sein. Transplantate, aus denen die T-Zellen entfernt wurden, vergrößern
10 das Risiko des Rückfalls zur CML (Champlin et al 1988; Horowitz et al 1990). Eine stringente Demonstration, des durch allo-BMT generierten Anti-Leukämie-Effektes kann man beobachten, wenn DLI verabreicht wird, sobald die Krankheit wiedererscheint. In dieser Konstellation kann DLI eine anhaltende molekulare Remission in bis zu 70% der Fälle wiedereinsetzen (MacKinnon 2000).
15 DLI steht aber auch mit einer signifikanten Toxizität, verursacht durch eine GVHD in Verbindung. Diese begleitet oft den Transplantat-gegen-Leukämie-(GVL) -Effekt. Die Mortalität liegt hierbei bei 50-90% (MacKinnon 2000).

Hinweise für Immunregulationen bei der CML:

- Erhöhtes Risiko eines Rückfalls bei T-Zell-Exklusion aus dem Transplantat
- 20 – Erhöhtes Risiko eines Rückfalls bei Abwesenheit von GVHD
- BMT von syngenem Zwillingen ist weniger effektiv als passendes BMT von Geschwistern
- Der Rückfall reagiert auf die Absetzung der Immunsuppression
- Spender-Leukozyten-Infusionen sind bei einem Rückfall effektiv
- 25 Die Allo-BMT stellt einen ziemlich groben Ansatz mit signifikanter Transplantat-bedingter Morbidität und Mortalität dar. Das Risiko zu sterben liegt bei 20 - 41% (Silver et al 1999). Diese Form der Immunotherapie bietet aber auch eine bis zu 70% Leukämie-freie Überlebensrate für die Transplantatempfänger (Clift & Anasetti 1997).

Behandlung der Abstoßungsreaktionen

Obwohl die Immunreaktion Organtransplantationen schwierig macht, gibt es wenige Alternativen bei Organausfällen. Die Verwendung von potenten immunsuppressiven Drogen, besonders Cyclosporin A und FK-506, die die Aktivierung von T-Zellen verhindern, macht Organtransplantationen erfolgreich. Trotzdem laufen hier bei z.B. Autoimmunerkrankungen einige Probleme auf, da das Leiden, welches das eigene Organ zerstört hat, auch das fremde Organ zerstört. Außerdem steigt durch die Unterdrückung des Immunsystems, das Risiko an Krebs oder Infektionen zu erkranken. Zudem ist die Prozedur sehr kostspielig (Janeway and Travers 1997).

Co-stimulatorische Moleküle

Das Produkt des Maus PD-1 Gens (ACCESSION NM_021893), einem Mitglied der IgG-Superfamilie, ist ein Rezeptor mit Verbreitung in vielen Geweben. Analysen, die durch Durchflusszytometrie und Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper J43mAk durchgeführt wurden, zeigten, dass das PD-1 Genprodukt ein 50 bis 55 kDa großes Membranprotein ist. Das PD-1 Protein scheint stark glycosyliert zu sein, da das berechnete Molekulargewicht der Aminosäuresequenz 29310 Da ist. Normales lymphoides Gewebe der Maus wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark enthalten nur eine geringe Anzahl an PD-1-positiven Zellen. Trotzdem erscheint eine signifikante PD-1-positive Population in Thymozyten ebenso wie auf T-Zellen in Milz- und Lymphknoten durch die *in vivo* -Behandlung mit Anti-CD3 monoklonalen Antikörpern. Weiterhin wurde die PD-1-Antigenexpression durch *in vitro* -Stimulation in verschiedenen Untergruppen von Thymozyten und Milz-T-Zellen stark induziert, entweder mit Anti-CD3 mAk oder Concavalin A, welches T-Zellen sowohl zur Aktivierung als auch zum Zelltod bringen kann. Die PD-1-Expression auf Milz-B-Zellen wurde in ähnlicher Weise mit Anti-IgM Ak stimuliert. Im Gegensatz dazu wurde PD-1 nach Behandlungen wie Wachstumsfaktorentzug, Dexamethason oder Lipopolysaccharid nicht signifikant exprimiert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Expression von PD-1 strikt reguliert ist und durch Signaltransduktion über den Antigenrezeptor

induziert wird und schließt nicht die Möglichkeit aus, dass das PD-1 Antigen in der klonalen Selektion von Lymphozyten eine Rolle spielt, obwohl für den normalen Ablauf der Apoptose PD-1 Expression nicht erforderlich ist (Agata et al 1996; Ishida et al 1992; Nishimura et al 1996).

5 Der PD-1 Rezeptor induziert die Verminderung von Immunantworten und sein Verlust führt zum Zusammenbruch der Toleranz in peripheren Geweben. PD-1 defiziente Mäuse entwickeln lupusartige proliferative Arthritis und Glomerulonephritis mit prädominanter IgG3 Ablagerung während des Alterns. PD-1 weist strukturelle Ähnlichkeit zum CTL-assoziierten Antigen 4 (CTLA-4) auf, welches
10 B7-1 und B7-2 bindet und eine entscheidende Rolle bei der Instandhaltung der T-Zell-Homeostase spielt [für Reviews, siehe (Sperling & Bluestone 1996; Thompson & Allison 1997)]. PD-1 enthält das MYPPPY Motiv nicht, welches kritisch für die B7-1 und B7-2 Bindung ist. Die extrazelluläre Region von PD-1 und CTLA-4 bestehen jeweils aus einer IgV-Domäne mit 23% Identität zueinander.
15 Zu PD-1 existiert ein Ligand (PD-L1). Die Bindung von PD-1 durch PD-L1 führt zur Inhibition der TCR-vermittelten T-Zell-Proliferation und Cytokinsekretion (Freeman et al 2000).

Das humane und Maus PD-L1 Molekül [EMBL/GenBank/DDBS unter Accessionnummern. AF233516 und AF233517, (Freeman et al 2000)] sind Mitglieder der
20 B7 Genfamilie und haben eine ähnliche strukturelle Organisation, die aus einer IgV und einer IgC Domäne in der extrazellulären Region (Boussiotis et al 1996), einer hydrophoben Transmembrandomäne, gefolgt von einer kurzen, geladenen intrazellulären Region besteht. Das humane PD-L1 ist mit 290 Aminosäuren identisch zu B7-H1, von welchem berichtet wird, dass es die T-Zell-Stimulation aktiviert (Dong et al 1999). Die Maus PD-L1 cDNA kodiert ein
25 Polypeptid mit 70% Aminosäureidentität zum humanen PD-L1. PD-L1 hat Aminosäureidentitäten von 21, 20, und 23% zu B7-1, B7-2, und ICOS (ligand of inducible co-stimulator) (Boussiotis et al 1996; Ling et al 2000; Swallow et al 1999; Yoshinaga et al 1999).

30 Die Expressionsmuster von B7-1, B7-2, und PD-L1 sind verschieden. B7-2, einer der Liganden von CD28 und CTLA-4, wird konstitutiv auf Monozyten

exprimiert. Die konstitutive Expression von B7-1 und B7-2 kann allerdings in keinem Organ beobachtet werden. Die B7-1 und B7-2 Expression kann in Dendritischen Zellen, Macrophagen und B-Zellen (Boussiotis et al 1996), sowie einigen Typen von Fibroblasten und Epithelzellen induziert werden. Im Kon-
5 trast dazu wird PD-L1 konstitutiv von nicht-lymphoiden, parenchymalen Organen wie dem Herzen, der Placenta, Skelettmuskeln und Lunge, nicht aber dem Dünndarm exprimiert (Dong et al 1999). PD-L1 wird auch in einigen Krebsarten exprimiert. Möglicherweise benutzen diese Tumoren PD-L1, um Antitumorimmunantworten zu inhibieren. Da PD-1 sowohl auf aktivierten T- als auch
10 B-Zellen exprimiert wird, könnte die Expression von PD-L1 in nicht-lymphoiden Geweben, sowie auf Dendritischen Zellen die Regulation von potentiell autoreaktiven Lymphozyten ermöglichen. Das könnte ein wichtiger Mechanismus sein, um Aktivitäten von T- und B-Zellen im Herzen, in der Lunge, in den Nieren und in der Placenta zu limitieren, wo PD-L1 hoch ex-priemiert ist (Freeman
15 et al 2000).

PD-1 Ligand 2 (PD-L2) ist ein zweiter Ligand für PD-1. Die Bindung von PD-1 mit PD-L2 inhibiert dramatisch die T-Zellrezeptor (TCR)-vermittelte Proliferation und Cytokinproduktion durch CD4 T-Zellen. Bei niedriger Antigenkonzentration inhibieren PD-L2PD-1-Interaktionen starke B7-CD28-Signale. Bei hohen
20 Antigenkonzentration reduzieren sie die Cytokinproduktion aber inhibieren nicht die T-Zellproliferation. PD-LPD-1-Interaktionen führen zum Zellzyklusarrest in G₀ /G₁ (Zellzyklusphasen) erhöhen aber nicht die Anzahl der toten Zellen. Die PD-L2-Expression auf APCs wird durch Behandlung mit Interferon g erhöht und konnte auch in einigen anderen Geweben und Tumorzelllinien detektiert werden. PD-L1 und PD-L2 haben also überlappende Funktionen
25 (Latchman et al 2001).

mPD-L2 (auch unter dem Namen Protein AF142780 bekannt) kodiert für ein Polypeptid mit 38% Aminosäureidentität zu mPD-L1. Murines und humanes PD-L2 haben 70% Aminosäureidentität. Die fünf Angehörigen der B7-Familie,
30 B7-1, B7-2, ICOS-L, PD-L1 und PD-L2, haben 21-27% Aminosäureidentität und eine strukturelle Organization, die aus einer Signalsequenz, einer IgV-artigen, einer IgC-artigen und einer transmembran Domäne und einem kurzen

cytoplasmatischen "Schwanz" besteht. Der cytoplasmatische Teil von PD-L1 ist zwischen Mäusen und Menschen konserviert, was im Kontrast zu der geringen Konservierung des cytoplasmatischen Teil von PD-L2 von Menschen und Mäusen steht (Latchman et al 2001).

5 Die PD-L2 Gewebeverteilung ist ähnlich wie die von PD-L1. Man findet eine Expression in Plazenta, Herz, Pankreas, Lunge und Leber, eine niedrige Expression in Milz, Lymphknoten und Thymus, keine Expression in unstimulierten Monozyten, die aber durch Interferon gamma induziert werden konnte. Die Kinetik dieser Induktion ist allerdings langsamer als die von PD-L1.

10 Funktionelle, reife Dendritische Zellen (DCs) entstehen aus zirkulierenden Vorläuferzellen nach einer Reifungsperiode. DCs können durch einen spezifischen Besatz Markermolekülen charakterisiert werden. Zu diesen gehören accessoirische/costimulatorische Genprodukte wie CD40, CD80, und CD86 sowie MHC Klasse I und II. Besonders das CD83 Molekül ist ein gut charakterisierter Marker für völlig reife DCs, da CD83 nicht auf unreifen DC-Vorläufern
15 detektiert werden kann. Die funktionelle Bedeutung von CD83 ist aber unbekannt. Seine stärker werdende Präsenz im Verlauf der Reifung deutet auf eine wichtige Funktion hin (Berchtold et al 1999).

Herpes Simplex Virus schafft es auf unbekannte Weise, die Expression von
20 CD83 zu unterdrücken, während die Produktion anderer für DCs typischer Moleküle wie CD25, CD40, CD80, CD86, CD95 und MHC der Klasse I und der Klasse II davon unbeeinflusst bleibt (Kruse et al 2000b). Interessanterweise führt die Inhibition der CD83 Expression an der Plasmamembran zu einer dramatischen Reduktion der DC-vermittelten T-Zell-Stimulation. Wird durch einen
25 spezifischen Inhibitor der eukaryotische Initiationsfaktor 5A behindert, kann die CD83 Expression verhindert werden, was auch zu einer starken Reduktion der DC-vermittelten T-Zell-Stimulation führt (Kruse et al 2000a). eIF-5A ist ein Protein, welches in den Exportpfad von spezifischen RNAs aus dem Zellkern einbezogen ist.

30 eIF-5A ist das einzige zelluläre Protein von dem man weiß, dass es die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin enthält. Diese Modifikation scheint für die

Zellteilung nötig zu sein. Die Hypusinmodifikation ist eine Spermidin-abhängige posttranslationale Reaktion, die von zwei Enzymen katalysiert wird. Das beinhaltet den Transfer der Aminobutylgruppe des Spermidin auf die e-NH₂-Gruppe von Lysin an Position 50 in eIF-5A durch die Deoxyhypusinsynthase
5 (Kruse et al 2000a).

Das Intermediat, welches dabei generiert wird, wird anschließend durch die Deoxyhypusinhydroxylase hydroxylisiert. Auf diese Art entsteht die aktive Form von eIF-5A. Obwohl eIF-5A ursprünglich als "Initiationsfaktor" bezeichnet wurde, zeigten jüngere in vitro and in vivo Experimente, dass eIF-5A kein
10 Initiator der Proteintranslation ist. eIF-5A scheint ein Teil eines spezifischen Exportpfades aus dem Zellkern zu sein, welcher z.B. von der Rev/Rex Klasse der retroviralen RNA Transportfaktoren ausgenutzt wird. Außerdem wurde gezeigt, dass das eIF-5A Protein sich an der nucleoplasmischen Seite des Kernporenkomplexes sammelt, um mit dem allgemeinen Kernexportrezeptor
15 CRM1 zu interagieren und um in Säugerzellen vom Nucleus in das Zytoplasma zu wandern. Untersuchungen der eIF-5A mRNA-Menge in humanen Zellen zeigte, dass eIF-5A in Zelllinien, sowie verschiedenen anderen Geweben konstitutiv exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird das eIF-5A Gen in primären lymphoiden Zellen während der Aktivierung und/oder Proliferation von primä-
20 ren human Blutzellen induziert. Benutzt man einen Inhibitor der Hypusinmodifikation [GC7 (N¹ -guanyl-1,7-diaminoheptane)], so wird die Expression von CD83 und damit die volle stimulatorische Aktivität reifer DCs inhibiert (Kruse et al 2000a).

25 Allgemeines zu Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen gehören zu den chronischen Erkrankungen. Zu ihnen zählen Rheuma in verschiedensten klinischen Ausprägungen, Diabetes, Multiple Sklerose, bestimmte Formen von Herzmuskelentzündungen und von Schilddrüsenerkrankungen. Die Reihe von Autoimmunerkrankungen lässt sich
30 fortsetzen, wobei ca. 90% allerdings epidemiologisch nur einen kleinen Prozentsatz ausmachen.

Die klinischen Verläufe von Autoimmunerkrankungen selbst bei ein- und derselben Diagnose können sehr unterschiedlich sein. Z. T. werden schubartige Krankheitsverläufe beobachtet. Entsprechend werden die Behandlungen vom Arzt individuell gestaltet.

- 5 Einige der Autoimmunerkrankungen sind antikörpervermittelt. Darunter wird in der Immunologie verstanden, dass der Organismus aus meist nicht bekannten Ursachen Antikörper produziert, welche sich gegen körpereigene zelluläre Strukturen (Autoantigene) richten. Sind diese Antikörper einmal gebildet, lösen sie durch ihre Interaktion und Bindung an die jeweiligen organ- oder zell-
- 10 spezifischen Strukturen eine zell- und gewebserstörende Reaktion des Immunsystems aus. Letztendlich führt diese dann zu dem klinischen Bild der Erkrankung (Steinman 1994).

Beispiel hierfür ist die Schilddrüsenerkrankung Morbus Basedow, aber auch eine Form der Herzmuskelentzündung, die zur Dilatativen Cardiomyopathie

15 führt. In einigen Fällen sind sowohl die Targets, gegen die sich die Autoantikörper richten, als auch die Autoantikörper selbst, genau charakterisiert.

WO-A-00/66715-A-, EP 1 179 587 und PCT/EP 02/03292 offenbaren Verfahren zur Reduzierung von spezifischen Immunreaktionen mittels gentechnisch manipulierter Antigen präsentierender Zellen. Es handelt sich dabei um Anmel-

20 dungen mit den gleichen Zielen, wie den hier beschriebenen, ohne dass allerdings CD83 dabei berücksichtigt wurde.

Das der Erfindung zu Grunde liegende Problem besteht unter anderem darin, gentechnologische, therapeutisch nutzbare Produkte für die Reduktion von spezifischen Immunreaktionen zur Verfügung zu stellen, bei denen Targets

25 (Antigene, Autoantigene) und Antikörper, Autoantikörper bekannt sind.

Gelöst wird das Problem durch die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle, die auch vorher bestimmte Antigene präsentieren kann (monoantigene Antigen präsentierende Zelle) und dadurch gekennzeichnet ist, dass in der Antigen präsentierende Zelle und/oder monoantigenen Antigen präsentierende

30 Zelle eine der Funktionen co-stimulatorischer Rezeptoren, wie ein CD83-

Rezeptor und gegebenenfalls B7- und/oder CD40-Rezeptor supprimiert ist und/oder gegebenenfalls CTLA4 bindende Moleküle produziert werden und/oder gegebenenfalls PD-1 bindende Moleküle vorzugsweise Antikörper produziert werden.

- 5 Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Zelle eine Antigen präsentierende Zelle (APC).

Die APCs sind die Schaltstellen des anpassungsfähigen Immunsystems. Sie können eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen oder abstellen.

- 10 Innerhalb des Immunsystems spielen die Antikörper normalerweise als spezifische Abwehrmoleküle ("humorale Immunreaktion") eine wichtige Rolle. Sie werden von ausgereiften B-Lymphozyten produziert. Die Induktion und Produktion der löslichen Antikörper erfolgt allerdings nicht unabhängig von den restlichen Zellen des Immunsystems; vielmehr wird diese humorale Immunreaktion von anderen Zellen des Immunsystems gesteuert.

- 15 Die Antikörperproduktion - und so auch die Produktion der pathologischen Autoantikörper - lässt sich nicht richtig aufrechterhalten ohne die Hilfe und Vermittlung von APCs und T-Helfer-Lymphozyten, die ihrerseits antigenspezifisch die B-Lymphozyten aktivieren.

- 20 Die molekularen Mechanismen der Interaktion - des Zell-Zell-Kontakts - von APCs mit den T-Helfer-Lymphozyten ist auf Rezeptorebene bis ins Detail bekannt.

Handelt es sich bei dem Antigen z.B. um ein Bakterienprotein, ist die Immunreaktion für den Organismus nützlich. Ist das Antigen allerdings eine körpereigene Struktur, spricht man von einer (pathologischen) Autoimmunreaktion.

- 25 Neben dem zu präsentierenden Antigen (gegen welches sich die zu produzierenden Antikörper richten) sind auf der Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren und Hilfsrezeptoren am Zell-Zell-Kontakt und der Zellaktivierung beteiligt. Ein essentielles Molekül der interzellulären Wechselwirkung bei der Antigenpräsentation (Kontakt von Monozyt mit den T-Helfer-Lymphozyten) ist ein costimulierender Rezeptor mit der Bezeichnung B7.
- 30

Die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle kann, vorzugsweise durch eine Transfektion einer Antigen präsentierende Zelle mit nukleinsäurehaltigem Material, eine erhöhte Expression eines Antigens aufweisen, wobei die Antigen präsentierende Zelle im wesentlichen nur vordefinierte Antigene präsentiert.

- 5 Das erfindungsgemäße gentherapeutische Verfahren beruht auf gentechnologischen Eingriffen an patienteneigenen Antigen präsentierende Zellen. Die Eingriffe erfolgen mittels geeigneter Sonden und bewirken die Verminderung von CD83-Molekülen und gegebenenfalls B7-Molekülen und/oder CD40-Molekülen durch die Behinderung bzw. Verhinderung der Ausbildung des Moleküls auf der Oberfläche der Antigen präsentierende Zellen und/oder gegebenenfalls CTLA4 bindenden Molekülen, vorzugsweise Antikörper, und/oder gegebenenfalls die Produktion von PD-1 bindenden Molekülen vorzugsweise PD-L1 und gegebenenfalls gleichzeitig eine starke Präsentation des Autoantigens.

Verminderung der spezifischen Antikörperproduktion durch Gentherapie

- 15 Die Produktion pathologischer Immunreaktionen wird durch die Manipulation von Antigen präsentierende Zellen und die daraus resultierende Abschaltung pathologischer T-Zellen spezifisch beendet. Die Unterdrückung der CD83 Expression interferiert mit den T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von DCs, welche in dieser Hinsicht die potentesten APCs sind. Hierfür können CD83-bindende Moleküle eingesetzt werden. Diese können CD83 beim Transport durch die Zelle abfangen oder auch auf der Plasmamembran binden und so eine Interaktion von CD83 mit anderen Molekülen verhindern. Zur Bindung an CD83 können Moleküle, wie Antikörper oder ein CD83-Ligand eingesetzt werden. Außerdem kann die Ausbildung von CD83 dadurch verhindert werden, dass die Ausbildung oder die Funktion von eIF-5A behindert wird. Zur Bindung an eIF-5A können Moleküle, wie z.B. Antikörper eingesetzt werden. Auch einen Inhibitor der Hypusinmodifikation [z.B. GC7 (N¹ -guanyl-1,7-diaminoheptane)] kann eingesetzt werden, um die Bildung von funktionellem eIF-5A zu verhindern. Auch die Antisensetechnologie, sowie Cosuppression bieten sich an, um die Ausbildung von CD83 und/oder eIF-5A zu verhindern.

Zusätzlich kann gegebenenfalls ausgenutzt werden, dass T-Zellen den Rezeptor PD-1 produzieren. Dieser sorgt bei Bindung an PD-L1 dafür, dass T-Zellen nicht mehr proliferieren. Eine Bindung von PD-1 kann also für das Abstellen von T-Zell-Antworten sorgen. Hierfür können auch andere Bindemoleküle als PD-L1 eingesetzt werden.

Es kann gegebenenfalls zusätzlich ausgenutzt werden, dass T-Zellen zwei Rezeptoren produzieren, die B7 (1 oder 2) erkennen. Der eine Rezeptor ist z. B. CD28, der andere ist z. B. CTLA4. CD28 entfaltet eine stimulierende Wirkung, während CTLA4 eine solche Wirkung nicht entfaltet. Der Kontakt von CTLA4 mit B7 sorgt für das Abschalten der jeweiligen T-Zelle. Diese geht dann entweder in die Apoptose über programmierten Zelltod, wird abgeschaltet, oder wird in eine toleranzerzeugende T-Zelle umgewandelt. Die Toleranz wird in diesem Fall gegen das spezielle von dieser T-Zelle erkannte Antigen erzeugt. (Gribben et al., 1994; Judge et al., 1999; Lee et al., 1998; Lin et al., 1998; Metzler et al., 1997; Olsson et al., 1999; Oosterwegel et al., 1999a; Oosterwegel et al., 1999b; Peach et al., 1994; Walunas et al., 1996; Wu et al., 1997; Wulfig and Davis, 1998).

Zur Bindung an CTLA4 anstatt von CD28 werden Moleküle, wie Antikörper, eingesetzt, die an CTLA4, nicht aber an CD28 binden. Diese können dann die von CTLA4 beförderte Reaktion der T-Zellen induzieren. Diese CTLA4 bindenden Moleküle können vorzugsweise Antikörper sein.

Der Co-Rezeptor B7, ohne den die Antigenpräsentation bzw. die Induktionskaskade zur Antikörperproduktion nicht anläuft, kann gegebenenfalls zusätzlich unterdrückt werden, um eine präferentielle Bindung von CD28 zu unterdrücken. Der Co-Rezeptor stellt zwei unterschiedliche Co-Rezeptoren, die als CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) bezeichnet werden, dar. Ihre Strukturen sind bekannt.

Nach dem Abschalten der Antikörperproduktion verschwinden die im Blut zirkulierenden Autoantikörper aufgrund des natürlichen Abbaus und des fehlenden Nachschubs.

Nach der *in vitro* Manipulation der Antigen präsentierende Zellen werden die Zellen in die Blutbahn des Patienten zurückgegeben. Die gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen schalten nunmehr die im Organismus befindlichen pathologischen T-Helfer-Lymphozyten ab. Die gentechnisch veränderten Zellen treten dabei unmittelbar in Konkurrenz zu den bereits im Organismus (vorzugsweise Blutbahn und Lymphsystem) vorhandenen PathoAntigen präsentierenden APCs, die normalerweise die T-Helfer-Lymphozyten und damit die Antikörperproduktion aktivieren.

Antigenpräsentation bei gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen

Die cDNA eines Proteins, das als Autoantigen die Produktion pathologischer Autoantikörper hervorruft, wird in das Genom der APC integriert. Diese Erbinformation dient dann zur Überproduktion des Autoantigens. Peptide dieses Autoantigens werden daraufhin bevorzugt an MHC II und/oder MHC I präsentiert. MHC II präsentiert die Peptide den T-Helferzellen und versucht solche zu finden, die spezifisch diese präsentierten Peptide erkennen. Wenn gleichzeitig CD83 nicht seiner Funktion nachkommen kann und eventuell zusätzlich durch ein PD-1 bindendes Molekül PD-1 anstelle von CD28 aktiviert wird und eventuell zusätzlich ein CTLA4 bindendes Molekül CTLA4 anstelle von CD28 aktiviert und eventuell zusätzlich der Co-Rezeptor B7 nicht seiner Funktion nachkommen kann, werden die T-Helferzellen stillgelegt und können eventuell einen vorzeitigen Zelltod erleiden, oder zu regulatorischen T-Zellen werden.

Alle gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen präsentieren an den meisten ihrer MHC II-Komplexe das Autoantigen, während *in vivo* nur sehr wenige "normale" APCs das Autoantigen präsentieren und dann auch nur an wenigen MHC II-Komplexen. Es ist Ziel der Behandlung, *in vivo* die "normalen" APCs, die das Autoantigen präsentieren und die T-Helfer-Zellen aktivieren, zu verdrängen durch die auf Abschaltung der Antikörperproduktion bzw. T-Zellantwort programmierten, gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen.

Die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle und/oder monoantigene Antigen präsentierende Zelle kann insbesondere eine erhöhte Anzahl von Homing-Rezeptoren, wie CD44, aufzeigen. Eine Überexpression von Homing-Rezeptoren wird der veränderten Antigen präsentierenden Zelle den Weg in die Lymphknoten weisen, wodurch die gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen sich vermehrt und schneller in Lymphknoten ansammeln. Die Lymphknoten sind der Ort, an dem die allermeisten Reaktionen des anpassungsfähigen Immunsystems hervorgerufen werden. Dort entfalten die gentechnisch veränderten Antigen präsentierenden Zellen daher eine um ein vielfaches höhere Wirkung als außerhalb der Lymphknoten.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Antigen präsentierenden Zelle bewirkt eine Transfektion eine Erhöhung der Anzahl von Homing-Rezeptoren und oder eine Erhöhung der Anzahl von PD-1 bindenden Molekülen und/oder eine Suppression von Funktionen der CD83-, B7-, CD40-Rezeptoren und/oder eine Erhöhung der Anzahl von CTLA4 bindenden Molekülen.

Die Ausbildung von funktionellem eIF-5A kann mit Inhibitoren der Hypusinsynthese verhindert werden.

Die PD-1 bindenden Moleküle können vorzugsweise PD-L1, PD-L2, Antikörper, monoklonale Antikörper sein. Diese können so geartet sein, dass sie in der Plasmamembran der Zelle verbleiben.

Die CTLA4 bindenden Moleküle können vorzugsweise Antikörper, monoklonale Antikörper sein. Diese können so geartet sein, dass sie in der Plasmamembran der Zelle verbleiben.

Insbesondere mit Antisense-Nukleinsäuren kann die eIF-5A, CD83-, B7- und/oder CD40-Rezeptorexpression in der erfindungsgemäßen Antigen präsentierenden Zelle verhindert oder reduziert werden.

Alternativ kann mit Nukleinsäuren eine Unterdrückung der Expression der eIF-5A, CD83-, B7- und/oder CD40-Rezeptoren durch Co-Suppression in der erfindungsgemäßen Antigen präsentierenden Zelle bewirkt werden.

Die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle kann Nukleinsäuren enthalten oder damit transfiziert sein, die eine Expression von mit eIF-5A, CD83-, B7- und/oder CD40-Rezeptoren affinen Strukturen aufweisenden Proteinen oder Peptiden bewirken. Damit werden Proteine gebildet, die durch Komplexbildung mit B7 - und/oder CD40-Rezeptoren diese Rezeptoren praktisch neutralisieren. Insbesondere kommen dazu CTLA4, CD28, Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder Fab-Fragmente als Proteine in Betracht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle Nukleinsäuren, die für eine Signalsequenz kodieren oder Expressionsprodukte einer Signalsequenz, die den Verbleib der Expressionsprodukte im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, dem Trans-Golgi-Netzwerk oder intrazellulären Vesikeln bewirkt.

Die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle wird zur Expression von Antigenen mit Nukleinsäuren transfiziert, die den Transport der exprimierten Antigene in MHC II-Kompartimente der Zellen ermöglichen.

Alle gentechnisch veränderten Antigen präsentierende Zellen präsentieren an den meisten ihrer MHC-Komplexe das Autoantigen, während nur sehr wenige "normale" APCs überhaupt das Autoantigen präsentieren und dann auch nur an wenigen MHC-Komplexen. Es ist Ziel der Behandlung, die "normalen" APCs, die das Autoantigen präsentieren und die T-Helfer-Zellen aktivieren, zu verdrängen durch die auf Abschaltung der Antikörperprodukte programmierten, genmanipulierten Antigen präsentierende Zellen. Es ist sinnvoll, das Antigen (die Antigene) in einer Form zu verabreichen, die den Transport in die MHC II-Endosomen ermöglicht. So kann zuverlässig eine Präsentation an MHC II erreicht werden. Bei einem gentechnischen Eingriff erfolgt dies in der Regel durch Manipulation des offenen Leserasters, so dass dem Leseraster eine Signalsequenz für dieses Kompartiment vorgeschaltet wird. Die genetische Manipulation hat den zusätzlichen Vorteil, dass sie eine viel längere Halbwertszeit hat, als z.B. Oligonukleotide oder Peptide. Eine stabile Integration von Genen kann sogar zu einer permanenten Veränderung der Eigenschaft der Zielzellen führen.

Die entsprechenden Nukleinsäuren können dabei DNA, RNA, Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNA) sein.

Vorzugsweise besitzt die DNA Regulationselemente wie Enhancer, Promotoren, polyA-kodierende 3'-Enden zur Transkription der DNA in RNA, die RNA Regulationselemente zur Translation der RNA in Protein. Die Regulationselemente sorgen für eine effiziente Expression der Gene.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Antigen präsentierende Zelle erfolgt zum Beispiel durch *ex vivo* oder *in vivo* Verfahren. Dabei wird vorzugsweise eine Antigen präsentierende Zelle *ex vivo* oder *in vivo* durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Antigen präsentierende Zelle transfiziert.

In einer weiteren Ausführungsform kann eine Antigen präsentierende Zelle oder eine monoantigene Antigen präsentierende Zelle durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Zelle mit erhöhter Menge von PD-1 bindenden Molekülen und/oder mit erhöhter Menge von CTLA4 bindenden Molekülen und/oder supprimierter Funktion co-stimulatorischer Rezeptoren, CD83, eIF-5A transfiziert werden oder die Expression co-stimulatorischer Rezeptoren, CD83, eIF-5A durch Verhinderung von deren Expression oder die co-stimulatorischen Rezeptoren, CD83, eIF-5A werden durch Reaktion mit affinen Strukturen an einer Stimulation von T-Zellen, die an die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle gebunden sind, gehindert.

Für die Unterdrückung der Co-Stimulation, CD83, eIF-5A, die letztendlich ein Unterdrücken der Produktion eines oder mehrerer Proteine oder die Behinderung des Proteins oder der Proteine bedeutet, kommen verschiedene Strategien in Frage:

1. Antisense-Ansatz

2. Co-Suppression

3. Bindung von CD83, eIF-5A und zusätzlich gegebenenfalls des co-stimulatorischen Moleküls.

5 Zu 1.: In diesem Fall müssen Antisense-Nukleinsäuren in Kontakt mit der mRNA des anvisierten Moleküls kommen. Sie binden dann wahrscheinlich das Molekül und verhindern die Translation. Als Nukleinsäuren kommen eine große Bandbreite von Molekülen, wie RNAs, DNAs, PNAs, Ribozyme, in Frage. Auch hier würde ein gentechnischer Eingriff für die
10 größte Halbwertszeit des Effekts sorgen.

 Zu 2.: Es hat sich inzwischen herausgestellt, dass man die Produktion eines Genproduktes auch durch Integration einer möglichst homologen Sense-Gensequenz erreichen kann. Der Mechanismus ist noch völlig unbekannt.

15 Zu 3.: Die Bindung des anvisierten Moleküls z.B. durch spezifische Antikörper verhindert, dass dieses Molekül Kontakt mit dem anvisierten Rezeptor auf einer T-Zelle aufnimmt und verhindert so die Aktivierung der T-Zelle. Die externe Zugabe solcher Bindemoleküle hat den Nachteil, dass sie auf alle Antigen präsentierenden Zellen wirken und damit jede
20 Immunreaktion verhindern. Um Immunreaktionen spezifisch zu behindern, haben wir ein Modell entworfen, bei dem die anvisierten Moleküle bereits in der Zelle, in einem intrazellulären Kompartiment gebunden werden. In einer Erweiterung dieses Modells soll dafür gesorgt werden, dass das Bindemolekül im intrazellulären Kompartiment zurückgehalten
25 wird, so dass das anvisierte Molekül erst gar nicht zur Plasmamembran gelangt. Hierfür sind Signalsequenzen bekannt, die dem offenen Leseraster des Bindemoleküls zugefügt werden müssen. Dieser intrazelluläre Ansatz lässt sich gut an isolierten Zellen durchführen. Auch hier ist ein gentechnischer Eingriff zu bevorzugen.

30 Die gewünschten Effekte können auch erreicht werden, wenn nur eines der

beiden Ziele mit einem gentechnischen Eingriff vorgenommen wird. In diesem Fall können statt der Gene z.B. folgende andere Moleküle eingesetzt werden:

1. Behinderung der anvisierten Moleküle durch

5 Nukleinsäuren (zumeist komplementär zur Zielsequenz), bei denen es sich z.B. um Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNAs) handeln kann,

Antikörper oder andere Moleküle, welche die anvisierten Moleküle binden.

2. Antigen Kontaktierung durch

Proteine, Peptide, Peptidomimetica.

10 Es werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren insbesondere Moleküle wie Antikörper, Proteine, Peptide, Peptidomimetica, PD-L1, PD-L2, CTLA4, CD28, CD40L und/oder Bestandteile und/oder Kombinationen dieser Moleküle, die z.B. B7-1, B7-2, CD40 binden, welche eine in Gegenwart einer Antigenpräsentation stattfindende Co-Stimulation der T-Zelle behindert, mit der monoantigenen Antigen präsentierenden Zelle und/oder der Antigen präsentierende Zelle in Kontakt gebracht.

15 Es kann vorteilhaft sein, die Moleküle mittels Vehikeln, wie Liposomen, Hydrogelen, Cyklodextrinen, Nanokapseln, Nanopartikel, insbesondere biologisch abbaubaren Nanokapseln oder -partikel, bio-adhäsiven Mikrokugeln und/oder durch 20 Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene Antigen präsentierende Zelle und/oder die Antigen präsentierende Zelle zu transferieren.

25 Nukleinsäuren können insbesondere durch Viren, virale Vektoren, bakterielle Vektoren, Plasmide, die durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene Antigen präsentierende Zelle und/oder die Antigen präsentierende Zelle transferiert werden.

30 Erfindungsgemäß beansprucht wird weiterhin ein Arzneimittel, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle. Vorzugswei-

se ist das erfindungsgemäße Arzneimittel als Infusionslösung zur intravenösen oder intraperitonealen Applikation formuliert. Die Formulierung ist so gewählt, dass bei Verabreichung des Arzneimittels keine wesentliche Beeinträchtigung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Antigen präsentierenden Zelle erfolgt.

- 5 So kommt als Infusionslösung vorzugsweise physiologische Kochsalzlösung in Betracht. Grundsätzlich sind auch andere Lösungen, die einen pH-Wert von 5,5 bis 8,5 aufweisen, geeignet. Auch Serum, beispielsweise humanes Serum, autologes Serum oder Serum anderer Spezies, Lösungen mit Plasmaersatzstoffen, wie Polyvinylpyrrolidon, kommen in Betracht. Typischerweise sollen 10 0,5 ml bis 500 ml appliziert werden. Diese Mengen und pH-Werte sind selbstverständlich nicht absolut, sondern können vom Fachmann, je nach Bedingungen und Anforderungen, variiert und an die spezifischen Bedürfnisse eines Patienten angepasst werden.

- Die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle kann insbesondere zur 15 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ungewollten Immunreaktionen, wie Autoimmunerkrankungen und Allergien oder gewollt hervorgerufenen Immunreaktionen, wie bei Immunisierungen verwendet werden.

- Weiterhin kann die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Immunreaktionen gegen allo- 20 loge und/oder xenologe Gewebsmerkmale verwendet werden.

Erfindungsgemäß beansprucht werden insbesondere Verwendungen, bei denen die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit Antigenen oder deren Gensequenzen und/oder Teilen davon stehen und ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 25 – Enzymen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Glutamic acid decarboxylase (GAD), Rezeptor-Typ Protein Tyrosin Phosphatase IA-2Beta, Antigen: $H^+K^+ATPase$, U1RNP, Transglutaminase, Argininosuccinatlyase (ASL), Tyrosinase-related protein-2, Thyroid Peroxidase, Faktor VIII, Faktor IX;
- 30 – Rezeptoren, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere

Acetylcholinrezeptor vom Nicotintyp, β_1 -adrenerger-Rezeptor, α_1 -adrenerger-Rezeptor, Angiotensin-2-AT1-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor, Thyrotropin-stimulierendes Hormon (TSH)-Rezeptor, LFA-1, HLA-B27, Epididymal Protein DE, Zona Pellucida (ZP)-3 Glycoprotein, Zona Pellucida (ZP)-4 Glycoprotein, Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Rezeptor, Sperm Immunogen SP-10 oder Sperm Protein SP-10;

- Hormone oder Botenstoffe, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Insulin, Thyroglobulin, Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Prostaglandin F2 alpha, Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), Oestradiol-17 β , Oestrogen, Luteinizing Hormon (LH) Rezeptor, Inhibin, Testosteron, Androgen, Chorionic Gonadotrophin (CG), Interleukine, Interferone, Cytokine, Chemokine, Bone Morphogenetic Factors, β -Interferon, Estradiol;
- Strukturproteine, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Myelin Basic Protein (MBP), Proteolipid protein (PLP), Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), α -Fodrin, Nicht-erythroides α -Spectrin, Beta-Amyloid Precursor Protein (beta-APP), Typ 2 Kollagen, Sperm Plasma Membran Protein PH-20;
- Antigene, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere CENP-A Autoantigen, Beta2GP-I, ribosomales P Protein, Ro/SSA, La/SSB, Sm/RNP, Sm, Scl-70, Jo-1, BCOADC-E2, Albumin, Glucagon, Inselzellantigene, Retinal S Ag;
- Allergene, die eine IgE-Antwort auslösen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 8, Eur m 1, Lep d 2, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Mus m 1, Rat n 1, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Per a 1, Bienengift Phospholipase A2 (PLA2), Group V major allergen Phl p 5b von Timothy Grass Pollen, Hom s 1.

Weiterhin wird erfindungsgemäß beansprucht eine Verwendung, bei der die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit allologenen und/oder xenogenen Gewebsmerkmalen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbe-

sondere MHC I, MHC II, Rhesus Faktor stehen.

Entwicklung einer Gentherapie

Das hier vorgestellte Verfahren zur Reduzierung von Immunantworten, z.B. zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit klar definiertem Autoantikörperprofil, basiert auf der gentechnischen Manipulation von bestimmten Blutzellen vorzugsweise außerhalb des Körpers, die dann anschließend wieder in den Organismus zurückgeführt werden. Ziel dieser Behandlung ist unter anderem das spezifische Abschalten einer chronischen, durch das Immunsystem getriebenen Produktion von Autoantikörpern, welche die Krankheit auslösen.

Anwendungsgebiete der Gentherapie

Das Verfahren zur spezifischen Abschaltung von Immunreaktionen ist immer dort sinnvoll, wo ein oder mehrere molekular definierte Targets (Antigene, Autoantigene) bekannt sind. Diese können beispielsweise mit einer Autoimmunerkrankung oder Allergie assoziiert sein.

Z.B. handelt es sich dabei um Krankheiten mit Autoantikörper-vermittelten Autoimmunreaktionen, d.h. um Krankheiten, bei denen die "Bindungsstrukturen" dieser Autoantikörper (Autoantigene, Targets) bekannt sind und pathogenetische Bedeutung haben.

Beispiele für Krankheiten mit bekannten, die Autoantikörper-bindenden molekularen Strukturen (Epitope) sind:

- Myasthenia gravis (Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor)
- Morbus Basedow (Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor der Schilddrüse)
- Dilatative Cardiomyopathie (DCM, Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor der Herzmuskelzellen)
- bestimmte Formen des insulinabhängigen Diabetes (Autoantikörper gegen Insulin)
- bestimmte Formen des malignen Bluthochdrucks (Autoantikörper gegen den Angiotensin- und/oder α_1 -adrenergen-Rezeptor).

Behandlung mit genmanipulierten patienteneigenen Blutzellen: Prinzip der vorgeschlagenen Gentherapie

Innerhalb des Immunsystems spielen die Antikörper als Abwehrmoleküle ("humorale Immunreaktion") eine wichtige Rolle. Sie werden von ausgereiften B-Lymphozyten (B-Zellen) produziert. Die Induktion und Produktion der Antikörper erfolgt allerdings nicht losgelöst von den restlichen Zellen des Immunsystems; vielmehr wird diese humorale Immunreaktion von anderen Zellen des Immunsystems gesteuert. Die Immunreaktion lässt sich nicht aufrechterhalten ohne die Hilfe und Vermittlung von Antigen präsentierenden Zellen und T-Helfer-Lymphozyten. Die molekularen Mechanismen der Interaktion - des Zell-Zell-Kontakts - von Antigen präsentierenden Zellen mit den T-Helfer-Lymphozyten ist auf Rezeptorebene bis ins Detail bekannt.

Neben dem zu präsentierenden Antigen sind auf der Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren und Hilfsrezeptoren am Zell-Zell-Kontakt und der Zellaktivierung beteiligt. Ein essentielles Molekül der interzellulären Wechselwirkung bei der Antigenpräsentation (Kontakt von Antigen präsentierenden Zellen mit den T-Helfer-Lymphozyten) sind costimulierende Rezeptoren mit den Bezeichnungen PD-L1, PD-L2, B7h (LICOS), B7-1 und B7-2. Auch CD40 spielt bei dieser Signaltransduktion eine Rolle. Auch CD83 hat auf einen Einfluss auf die Stimulationsfähigkeit von DCs.

Die Funktionen von ICOS, PD-1, CD28, CTLA4, B7 und CD40 sind Inhalt zahlreicher Publikationen (Daikh et al., 1997; Greenfield et al., 1998; Johnson-Leger et al., 1998; McAdam et al., 1998; Vyth-Dreese et al., 1995, (Freeman et al 2000; Hutloff et al 1999; Kopf et al 2000; Tamatani et al 2000)) und werden (außer ICOS, PD1) auch umfangreich in Lehrbüchern abgehandelt [s. z.B. (Janeway and Travers, 1997)]. Auch CD83 wird in der Literatur behandelt (Berchtold et al 1999; Kruse et al 2000a; Kruse et al 2000b). Seine genauen Funktionsmechanismen sind allerdings noch weitestgehend unbekannt.

Das konzipierte Verfahren beruht auf bis zu zwei parallelen Eingriffen an patienteneigenen Antigen präsentierende Zellen. Die Eingriffe erfolgen mittels geeigneter Sonden und bewirken

- 31 -

- die Abschaltung von CD83 und/oder eIF-5A, wodurch DCs an der Aktivierung von T-Zellen gehindert werden
- und gegebenenfalls die Produktion eines PD-1 bindenden Moleküls, wie z.B. PD-L1, die über die Wirkung von PD-1, welches in T-Zellen vorkommt, die T-Zellen an der Aktivierung und Proliferation hindert
- und gegebenenfalls die Produktion eines CTLA4 bindenden Moleküls, wie z.B. Antikörpern, die über die Wirkung von CTLA4, welches in T-Zellen vorkommt, die T-Zellen an der Aktivierung hindert
- und gegebenenfalls die Abschaltung von B7 und damit die Verhinderung der Ausbildung des Moleküls auf der Oberfläche der Antigen präsentierende Zellen und/oder die Abschaltung von CD40
- und gegebenenfalls gleichzeitig eine starke Präsentation des Autoantigens/der Autoantigene auf den Antigen präsentierende Zellen

Sollte die Manipulation der Zellen, die Antigen präsentierende Zellen sind, *ex vivo* erfolgen, werden die Zellen in die Blutbahn des Spenders zurückgegeben. Die genmanipulierten Antigen präsentierende Zellen schalten nunmehr die im Organismus befindlichen entsprechenden T-Helfer-Lymphozyten ab. Die genmanipulierten Zellen treten dabei unmittelbar in Konkurrenz zu den bereits im Organismus (vorzugsweise Blutbahn und Lymphsystem) vorhandenen Autoantigen präsentierenden APCs, die allerdings B7 und kein zusätzliches PD-1 bindendes Molekül, CTLA4 bindendes Molekül auf der Zelloberfläche tragen und, wenn sie reife DCs sind, CD83 an der Plasmamembran haben und normalerweise die T-Helfer-Lymphozyten und damit unter anderem die Antikörperproduktion aktivieren.

Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantatabstoßungsreaktionen: Stand der Technik

Kausaltherapien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien existieren nicht. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (extrakorporale Elimination der Antikörper aus dem Blut der Patienten bzw. Plasmapherese), erfolgt die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien medikamentös

durch eine Hemmung von Reaktionen des Immunsystems.

Nach wie vor am gebräuchlichsten ist die medikamentöse Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantatabstoßungsreaktionen mit immunsuppressiven Präparaten wie Cortison und dessen Abkömmlingen, sowie
5 Cyclosporin, Beta-Interferon oder Zytostatika (Methothrexat). Desweiteren werden Antikörper, Antagonisten und Oligonukleotide gegen verschiedene Signalkomponenten des Immunsystems mit dem Zweck erprobt, die Aktivierung von T-Zellen zu verhindern. Solche Arzneimittel sind bestenfalls selektiv, nie aber spezifisch gegen die falsch programmierten Autoimmunreaktionen
10 gerichtet. Immunsuppressiva haben daher auf wichtige, notwendige und nützliche Teile des Immunsystems eine negative Wirkung; aus diesem Grund und ihrer Nebenwirkungen wegen ist ihr Einsatz begrenzt.

Von den immunsuppressiven Therapien unterscheidet sich das vorgelegte Konzept einer Gentherapie zur Reduktion von spezifischen Immunreaktionen
15 grundlegend. Es wird eine spezifische Abschaltung fehlgeleiteter immunologischer Reaktionen durch gentechnisch umprogrammierte patienteneigene Blutzellen durchgeführt.

Die aufgezeigte Methodik ist als allgemein gültiges Konzept zur Reduzierung von Immunantworten gedacht. Es sollte mit diesem Grundkonzept möglich
20 sein, jede Immunreaktion des anpassungsfähigen Immunsystems wieder abzustellen. Außerdem können nach Belieben solche Immunreaktionen hervorgerufen und dann wieder abgestellt werden.

Literatur

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., et al. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-72.
- 5 Berchtold, S., Muhl-Zurbes, P., Heufler, C., Winklehner, P., Schuler, G., Steinkasserer, A. 1999. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett* 461:211-6.
- Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Nadler, L. M. 1996. The role
10 of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev* 153:5-26.
- Champlin, R. E., Goldman, J. M., Gale, R. P. 1988. Bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 25:74-80.
- 15 Clift, R. A., Anasetti, C. 1997. Allografting for chronic myeloid leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 10:319-36.
- Daikh D., Wofsy D. and Imboden J. (1997) The CD28-B7 costimulatory pathway and its role in autoimmune disease. *J Leukoc Biol* 62, 165-62.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., Baltimore, D. 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome.
20 *Science* 247:824-30.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-9.
- 25 Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., et al. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-34.

Greenfield, E., K. Nguyen, and V. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* 18:389-418.

Gribben, J., G. Freeman, L. Nadler, P. Rennert, C. Jellis, E. Greenfield, and G. Gray. 1994. Ligands for induction of antigen specific apoptosis in T cells. In Patent. Repligen Corp. (US); Dana Faber Cancer Inst. Inc. (US).

Janeway J.C.A. and Travers P. (1997) Immunobiology - The immune system in health and disease. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., London, San Francisco and New York

Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75:555-62.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., et al. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-6.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11:3887-95.

Johnson-Leger, C., J. Christensen, and G. Klaus. 1998. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *Int Immunol.* 10:1083-1091.

Judge, T.A., Z. Wu, X.G. Zheng, A.H. Sharpe, M.H. Sayegh, and L.A. Turka. 1999. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J Immunol.* 162:1947-1951.

Kopf, M., Coyle, A. J., Schmitz, N., Barner, M., Oxenius, A., et al. 2000. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192:53-61.

Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., et al. 2000a. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 191:1581-90.

Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., et al. 2000b. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol* 74:7127-36.

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., et al.
5 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. 2:261-268.

Lee, K.M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattry, D.K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L.E. Samelson, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*. 282:2263-2266.

10 Lewalle, P., Hensel, N., Guimaraes, A., Couriel, D., Jiang, Y. Z., et al. 1996. Helper and cytotoxic lymphocyte responses to chronic myeloid leukaemia: implications for adoptive immunotherapy with T cells. *Br J Haematol* 92:587-94.

Lin, H., J.C. Rathmell, G.S. Gray, C.B. Thompson, J.M. Leiden, and M.L. Alegre.
15 1998. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J Exp Med*. 188:199-204.

Ling, V., Wu, P. W., Finnerty, H. F., Bean, K. M., Spaulding, V., et al. 2000.
20 Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 164:1653-7.

MacKinnon, S. 2000. Who may benefit from donor leucocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation? *Br J Haematol* 110:12-7.

McAdam, A., A. Schweitzer, and A. Sharpe. 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immu-
25 nol Rev*. 165:231-247.

Metzler, W.J., J. Bajorath, W. Fenderson, S.Y. Shaw, K.L. Constantine, J. Naemura, G. Leytze, R.J. Peach, T.B. Lavoie, L. Mueller, and P.S. Linsley. 1997. Solution structure of human CTLA-4 and delineation of a CD80/CD86 binding site conserved in CD28 [letter]. *Nat Struct Biol*. 4:527-531.

Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., et al. 1996. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol* 8:773-80.

5 Olsson, C., K. Riesbeck, M. Dohlsten, E. Michaelsson, and K. Riebeck. 1999. CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts [published erratum appears in J Biol Chem 1999 Jul 23;274(30):21490]. *J Biol Chem*. 274:14400-14405.

Oosterwegel, M.A., R.J. Greenwald, D.A. Mandelbrot, R.B. Lersbach, and A.H. Sharpe. 1999a. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol*. 11:294-300.

10 Oosterwegel, M.A., D.A. Mandelbrot, S.D. Boyd, R.B. Lersbach, D.Y. Jarrett, A.K. Abbas, and A.H. Sharpe. 1999b. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J Immunol*. 163:2634-2639.

Peach, R.J., J. Bajorath, W. Brady, G. Leytze, J. Greene, J. Naemura, and P.S. Linsley. 1994. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med*. 180:2049-2058.

15 Silver, R. T., Woolf, S. H., Hehlmann, R., Appelbaum, F. R., Anderson, J., et al. 1999. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94:1517-36.

Sperling, A. I., Bluestone, J. A. 1996. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev* 153:155-82.

25 Steinman L. (1994) Autoimmunerkrankungen. Spektrum der Wissenschaften (Spezial: Das Immunsystem) 64-73.

Swallow, M. M., Wallin, J. J., Sha, W. C. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 11:423-32.

Tamatani, T., Tezuka, K., Hanzawa-Higuchi, N. 2000. AILIM/ICOS: a novel lymphocyte adhesion molecule. *Int Immunol* 12:51-5.

Thompson, C. B., Allison, J. P. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7:445-50.

Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., et al. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827-32.

5 Vyth-Dreese, F., T. DelleMijn, D. Majoor, and D. de Jong. 1995. Localization in situ of the co-stimulatory molecules B7.1, B7.2, CD40 and their ligands in normal human lymphoid tissue. *Eur J Immunol.* 25:3023-3029.

Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation [published erratum appears in J Exp Med 10 1996 Jul 1;184(1):301]. *J Exp Med.* 183:2541-2550.

Wu, Y., Y. Guo, A. Huang, P. Zheng, and Y. Liu. 1997. CTLA-4-B7 interaction is sufficient to costimulate T cell clonal expansion. *J Exp Med.* 185:1327-1335.

Wulfig, C., and M.M. Davis. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science.* 282:2266-2269.

Patentansprüche

1. Antigen präsentierende Zelle (APC), dadurch gekennzeichnet, dass in der APC die Funktion von CD83 und/oder des eukaryotischen Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) und gegebenenfalls eine der Funktionen co-stimulatorischer
5 Rezeptoren, wie B7- und gegebenenfalls CD40-Rezeptoren supprimiert sind und gegebenenfalls ein CTLA4 bindendes Molekül produziert wird und gegebenenfalls ein PD-1 bindendes Molekül produziert wird.
2. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigen präsentierende Zelle ein Monozyt, eine dendritische Zelle,
10 eine B-Zelle (B-Lymphozyt) und/oder ein Makrophage ist.
3. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigen präsentierende Zelle überwiegend vorher bestimmte Antigene präsentiert (monoantigene Antigen präsentierende Zelle).
- 15 4. Monoantigene Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch Transfektion einer Antigen präsentierenden Zelle mit nukleinsäurehaltigem Material eine erhöhte Expression der so vordefinierten Antigene erfolgt und die Antigen präsentierende Zelle im wesentlichen nur diese Antigene präsentiert.
- 20 5. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle eine erhöhte Anzahl von Homing-Rezeptoren, wie CD44, aufweist.
- 25 6. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Transfektion eine Suppression von Funktionen der CD83-, eIF-5A-Moleküle, B7-, CD40-Rezeptoren und/oder die Expression von CTLA4 bindenden Molekülen und/oder eine Expression von PD-1 bindenden Molekülen und gegebenenfalls eine Erhöhung der Anzahl von Homing-Rezeptoren bewirkt.

7. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 enthaltend Nukleinsäuren, die PD-1 bindende Moleküle kodieren und/oder CTLA4 bindende Moleküle kodieren und/oder Antisense-Nukleinsäuren zur Verhinderung der CD83, eIF-5A, B7- und/oder CD40-Rezeptor Expression.
- 5 8. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 enthaltend Nukleinsäuren, die eine Unterdrückung der Expression der CD83-Moleküle, eIF-5A, B7- und/oder CD40-Rezeptoren durch Co-Suppression bewirken.
- 10 9. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 bei denen die PD-1 bindenden Moleküle vorzugsweise PD-L1, PD-L2, Antikörper, monoklonale Antikörper, Einzelkettenantikörper (scFv) sind.
10. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 enthaltend Nukleinsäuren, die für PD-1 bindende Moleküle kodieren, die in der Plasmamembran der Zelle verbleiben.
- 15 11. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 enthaltend Nukleinsäuren, die eine Expression von mit CD83-Molekülen, eIF-5A, B7- und/oder CD40-Rezeptoren affinen Strukturen aufweisenden Proteinen oder Peptiden bewirken.
- 20 12. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 11, wobei die Proteine, die affine Strukturen zu CD83-Molekülen aufweisen Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder Fab-Fragmente sind.
13. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 11, wobei die Proteine, die affine Strukturen zu eIF-5A aufweisen Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder Fab-Fragmente sind.
- 25 14. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 11, wobei die Proteine, die affine Strukturen zu B7-Rezeptoren aufweisen CTLA4, CTLA4-Derivate (z.B. CTLA4Ig), CD28, Antikörper, F(ab)₂, scFv und/oder Fab-Fragmente sind.
15. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 11 und/oder 12 und/oder 14, wobei die Nukleinsäuren für eine Signalsequenz kodieren oder die Expres-

sionsprodukte eine Signalsequenz besitzen, die den Verbleib der Expressionsprodukte im endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, dem Trans-Golgi-Netzwerk oder intrazellulären Vesikeln bewirkt.

5 16. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die erfindungsgemäße Antigen präsentierende Zelle zur Expression von Antigenen mit Nukleinsäuren transfiziert ist, die den Transport der exprimierten Antigene in MHC II-Kompartimente der Zellen ermöglicht.

10 17. Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren DNA, RNA, Oligonukleotide, Polynukleotide, Ribozyme, Peptidnukleinsäuren (PNA) sind.

15 18. Antigen präsentierende Zelle nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA Regulationselemente wie Enhancer, Promotoren, polyA-kodierende 3'-Enden zur Transkription der DNA in RNA enthält, die RNA Regulationselemente zur Translation der RNA in Protein enthält.

19. Verfahren zur Herstellung der Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 durch *ex vivo* oder *in vivo* Verfahren.

20 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei eine Antigen präsentierende Zelle *ex vivo* oder *in vivo* durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden, die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Antigen präsentierende Zelle transfiziert wird.

25 21. Verfahren nach Anspruch 19 und/oder 20, wobei eine Antigen präsentierende Zelle oder eine monoantigene Antigen präsentierende Zelle durch Behandlung mit Viren, viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, Plasmiden die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistischen Methoden und/oder anderen Techniken zur Einschleusung von Molekülen in eine Zelle mit erhöhter Produktion von PD-1 bindenden Molekülen und/oder CTLA4 bindenden Molekülen und/oder mit supprimierter
30

Funktion co-stimulatorischer Rezeptoren, CD83-, eIF-5A-Molekülen transfiziert wird, die Expression co-stimulatorischer Rezeptoren, CD83-, eIF-5A-Molekülen durch Verhinderung deren Expression oder die co-stimulatorischen Rezeptoren, CD83-, eIF-5A-Moleküle durch Reaktion mit affinen Strukturen an einer Stimulation von T-Zellen, die an die Antigenpräsentierende Zelle oder monoantigene Antigenpräsentierende Zelle gebunden sind, verhindert wird.

22. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei Moleküle wie Antikörper, Proteine, Peptide, Peptidomimetica, PD-L1, PD-L2, PD-1 bindende Moleküle, CTLA4 bindende Moleküle, CTLA4, CTLA4-Derivate (z.B. CTLA4Ig), CD28, CD40L und/oder Bestandteile und/oder Kombinationen dieser Moleküle, die z.B. PD-1, CTLA4, B7-1, B7-2, CD40 binden, welche eine in Gegenwart einer Antigenpräsentation stattfindende Stimulation und/oder Co-Stimulation der T-Zelle behindert, mit der monoantigenen Antigenpräsentierenden Zelle oder der Antigenpräsentierenden Zelle in Kontakt gebracht werden.

23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei die Moleküle gemäß Anspruch 20 durch Vehikel, wie Liposomen, Hydrogele, Zyklodextrine, Nanokapseln, Nanopartikel, bio-adhäsive Mikrokugeln und/oder durch Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene Antigenpräsentierende Zelle oder die Antigenpräsentierende Zelle transferiert werden.

24. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei Nukleinsäuren durch Viren, virale Vektoren, bakterielle Vektoren, Plasmide die durch viralen Gentransfer, Elektroporationstechniken, Iontophorese, ballistische Methoden und/oder andere Techniken zur Einschleusung von Molekülen in die monoantigene Antigenpräsentierende Zelle oder die Antigenpräsentierende Zelle transferiert werden.

25. Antigenpräsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass ein Inhibitor der Hypusinbiosynthese,

wie z.B. GC7 (N¹ -guanyl-1,7-diaminoheptane) verwendet wird, um die Produktion von funktionalem eIF-5A zu behindern.

26. Arzneimittel enthaltend mindestens eine Antigen präsentierende Zelle oder monoantigene Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18.

27. Arzneimittel nach Anspruch 26, wobei mindestens eine Antigen präsentierende Zelle oder monoantigene Antigen präsentierende Zelle als Infusionslösung zur intravenösen oder intraperitonealen Applikation formuliert ist.

28. Verwendung mindestens einer Antigen präsentierenden Zelle oder monoantigenen Antigen präsentierenden Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ungewollten Immunreaktionen, wie Autoimmunerkrankungen und Allergien oder gewollt hervorgerufenen Immunreaktionen, wie bei Immunisierungen.

29. Verwendung mindestens einer Antigen präsentierende Zelle oder monoantigenen Antigen präsentierende Zelle nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Immunreaktionen gegen allologe und/oder xenologe Gewebsmerkmale.

30. Verwendung nach Anspruch 28, wobei die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit Antigenen oder deren Gensequenzen und/oder Teilen davon stehen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- Enzymen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Glutamic acid decarboxylase (GAD), Rezeptor-Typ Protein Tyrosin Phosphatase IA-2Beta, H⁺K⁺ATPase, U1RNP, Transglutaminase, Argininosuccinatelyase (ASL), Tyrosinase-related protein-2, Thyroid Peroxidase, Faktor VIII, Faktor IX;

- Rezeptoren, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Acetylcholinrezeptor vom Nicotintyp, Myasthenia gravis, β_1 -adrenerger Rezeptor, α_1 -adrenerger-Rezeptor, Angiotensin-2-AT1-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor, Thyrotropin-stimulierendes Hormon (TSH)-Rezeptor, LFA-1, HLA-B27, Epididymal Protein DE, Zona Pellucida

- 43 -

(ZP)-3 Glycoprotein, Zona Pellucida (ZP)-4 Glycoprotein, Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Rezeptor, Sperm Immunogen SP-10 oder Sperm Protein SP-10;

5 – Hormone oder Botenstoffe, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Insulin, Thyroglobulin, Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Prostaglandin F2 alpha, Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), Oestradiol-17beta, Oestrogen, Luteinizing Hormon (LH) Rezeptor, Inhibin, Testosteron, Androgen, Chorionic Gonadotrophin (CG), Interleukine, Interferone, Cytokine, Chemokine, Bone Morphogenetic

10 Factors, b-Interferon, Estradiol;

– Strukturproteine, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Myelin Basic Protein (MBP), Proteolipid protein (PLP), Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), a-Fodrin, Nicht-erythroides a-Spectrin, Beta-Amyloid Precursor Protein (beta-APP), Typ 2 Kollagen,

15 Sperm Plasma Membran Protein PH-20;

– Antigene, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere CENP- A Autoantigen, Beta2GP-I, ribosomales P Protein, Ro/SSA, La/SSB, Sm/RNP, Sm, Scl-70, Jo-1, BCOADC-E2, Albumin, Glucagon, Inselzellantigene, Retinal S Ag;

20 – Allergene, die eine IgE-Antwort auslösen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 8, Eur m 1, Lep d 2, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Mus m 1, Rat n 1, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Per a 1, Bienengift Phospholipase A2 (PLA2), Group V major allergen Phl p

25 5b von Timothy Grass Pollen, Hom s 1.

31. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die zu behandelnden Immunreaktionen in Verbindung mit allologenen und/oder xenogenen Gewebsmerkmalen, deren Gensequenzen und/oder Teilsequenzen, insbesondere MHC I, MHC II, Rhesus Faktor steht.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/08 C12N5/10 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/00
A61P33/00 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 66715 A (SHERIFF A) 9 November 2000 (2000-11-09) cited in the application the whole document	1-31
A	KRUSE MONIK ET AL: "Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 191, no. 9, 1 May 2000 (2000-05-01), pages 1581-1589, XP002195943 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document	1-31
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2002

Date of mailing of the international search report

23/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07740

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KRUSE MONIKA ET AL: "Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 15, August 2000 (2000-08), pages 7127-7136, XP002195944 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	1-31
A	LATCHMAN YVETTE ET AL: "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." NATURE IMMUNOLOGY, vol. 2, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 261-268, XP001064842 ISSN: 1529-2908 cited in the application the whole document	1-31
P,X	EP 1 179 587 A (GENETHOR) 13 February 2002 (2002-02-13) cited in the application the whole document	1-31
E	WO 02 077208 A (GENETHOR GMBH) 3 October 2002 (2002-10-03) the whole document	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/07740

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0066715	A	09-11-2000	DE 19944858 A1	29-03-2001
			EP 1085085 A1	21-03-2001
			AU 5211200 A	17-11-2000
			WO 0066715 A1	09-11-2000
			EP 1173550 A1	23-01-2002
EP 1179587	A	13-02-2002	EP 1179587 A1	13-02-2002
WO 02077208	A	03-10-2002	WO 02077208 A1	03-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07740

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12N5/08 A61P33/00	C12N5/10 A61P31/00
A61K39/00	A61P35/00	A61P37/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 C12N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00 66715 A (SHERIFF A) 9. November 2000 (2000-11-09) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-31
A	KRUSE MONIK ET AL: "Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 191, Nr. 9, 1. Mai 2000 (2000-05-01), Seiten 1581-1589, XP002195943 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-31
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
17. Oktober 2002		23/10/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Moreau, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KRUSE MONIKA ET AL: "Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 74, Nr. 15, August 2000 (2000-08), Seiten 7127-7136, XP002195944 ISSN: 0022-538X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	1-31
A	<p>LATCHMAN YVETTE ET AL: "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." NATURE IMMUNOLOGY, Bd. 2, Nr. 3, März 2001 (2001-03), Seiten 261-268, XP001064842 ISSN: 1529-2908 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	1-31
P,X	<p>EP 1 179 587 A (GENETHOR) 13. Februar 2002 (2002-02-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	1-31
E	<p>WO 02 077208 A (GENETHOR GMBH) 3. Oktober 2002 (2002-10-03) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/07740

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 19-24 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07740

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0066715	A	09-11-2000	DE 19944858 A1 29-03-2001
		EP 1085085 A1 21-03-2001	
		AU 5211200 A 17-11-2000	
		WO 0066715 A1 09-11-2000	
		EP 1173550 A1 23-01-2002	
EP 1179587	A	13-02-2002	EP 1179587 A1 13-02-2002
WO 02077208	A	03-10-2002	WO 02077208 A1 03-10-2002